

University of Groningen

Protein engineering of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251

Penninga, Dirk

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1996

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Penninga, D. (1996). *Protein engineering of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

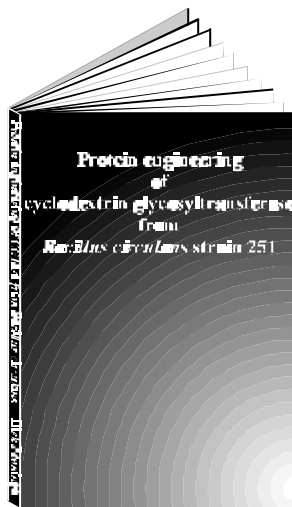
Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

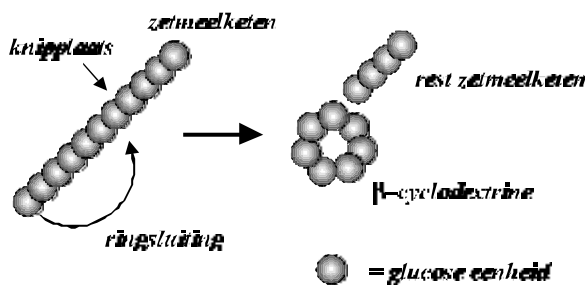
SAMENVATTING





De titel van dit proefschrift, “Protein engineering of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251”, kan als volgt vertaald worden: Protein engineering is “het rationeel veranderen of creëren van een eiwit”. Cyclodextrin glycosyl-transferase (CGTase) duidt aan dat het gaat om een eiwit (enzym) dat cyclodextrinen maakt via een overzetting van een glycosylbinding, zoals een binding tussen verschillende suikereenheden genoemd wordt. Cyclodextrinen zijn glucosepolymeren die kop-staart aan elkaar verbonden zijn waardoor ze een cirkel vormen. Het enzym is afkomstig van een bodem-bacterie met de naam *Bacillus circulans* (stam 251).

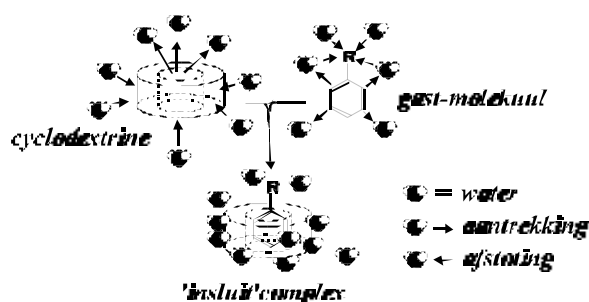
Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven richt zich op de opheldering van de werking en de eigenschappen van CGTase. Dit enzym kan cirkelvormige molekulen (cyclodextrinen) maken uit de lange ketens van duizenden glucose (een koolhydraat of suiker) molekulen waaruit zetmeel bestaat. De meest voorkomende cyclodextrinen bestaan uit ringen van 6, 7 of 8 (respectievelijk α -, β - of γ -cyclodextrine) glucosemolekulen (zie Figuur 1).



Figuur 1. De vorming van een cyclodextrine uit een zetmeelketen door het enzym CGTase.

Cyclodextrinen kunnen als een soort cylinders beschouwd worden; door hun vouwing beschikken ze over speciale kenmerken. Ze zijn bijvoorbeeld oplosbaar in water, terwijl stoffen die slecht in water oplossen zich juist heel goed in zo’n cylinder thuis voelen (Figuur 2). Stoffen die ingesloten worden door een cyclodextrine kunnen hierdoor qua chemische en fysische eigenschappen veranderen. Voorbeelden hiervan zijn: stabilisatie van licht- en zuurstofgevoelige stoffen, verbetering van de oplosbaarheid, maskeren van vieze smaak,

penetrante geur of kleur, en bescherming tegen afbraak door micro-organismen. Cyclodextrinen kunnen door hun eigenschappen toegepast worden in de analytische-, voedings-, cosmetische-, wasmiddelen- en farmaceutische industriën. Als voorbeeld kan genoemd worden de eigenschap van 'slow-release' van medicijnen: opgesloten in cyclodextrinen komen medicijnen langzaam en gelijkmatig vrij omdat cyclodextrinen slechts langzaam door het menselijk lichaam worden afgebroken. De eigenschappen en toepassingen van de verschillende cyclodextrinen hangen voornamelijk af van hun grootte.



Figuur 2. De vorming van een 'insluit'complex van een slecht in water oplosbare stof (gastmolekuul) met een cyclodextrine.

Voor de productie van cyclodextrinen wordt zetmeel op een speciale manier in hoge concentratie opgelost. Door vervolgens het enzym CGTase toe te voegen komt de synthese van cyclodextrinen op gang. Na afloop van het syntheseproces worden de cyclodextrinen gezuiverd. Aan dit productieproces kleven enige duidelijke nadelen: Er wordt altijd een mengsel van cyclodextrinen (α-, β- en γ-cyclodextrine) geproduceerd waarbij slechts ongeveer 40% van de zetmeel wordt omgezet. Dit wordt onder meer veroorzaakt doordat het gevormde product de reactie remt (productremming). Met behulp van organische oplosmiddelen is het wel mogelijk om tot verbetering van dit proces te komen, echter als het gaat om het produceren van cyclodextrinen die gebruikt zullen worden voor menselijke consumptie vormen deze (giftige) oplosmiddelen natuurlijk een groot probleem.

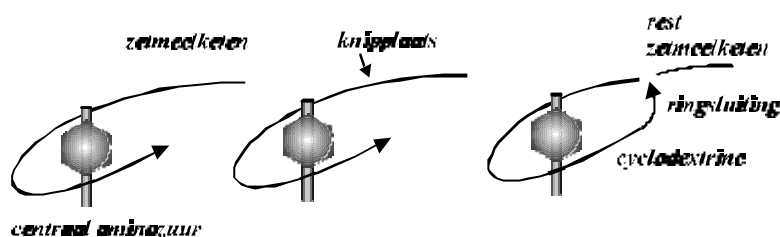
Enige jaren geleden is door ons een project gestart met als doel het verkrijgen van meer inzicht in de werking en de eigenschappen van het enzym CGTase van *B. circulans* stam 251. Gehoopt werd dat uit dit onderzoek duidelijk zou worden of het creëren van een mutant CGTase enzym dat slechts één type cyclodextrine maakt, en dat meer dan 40 % van het zetmeel in cyclodextrinen omzet, haalbaar is. Gekozen werd voor een benadering door middel van "protein engineering". Sinds ongeveer 20 jaar is het mogelijk geworden onderzoek aan eiwitten te doen door de volgorde van de specifieke bouwstenen, de aminozuren, in een eiwit te veranderen. Dit "veranderen of aanpassen van een eiwit" kan alleen op een rationele manier geschieden als er van dit eiwit een gedetailleerde ruimtelijke

vorm, de zogenaamde driedimensionale structuur, bekend is. Die structuur kan bepaald worden na kristallisatie van het gezuiverde eiwit. Met behulp van röntgenstraling kan vervolgens een verstrooiingspatroon opgenomen worden wat na een uitgebreide computeranalyse een driedimensionaal computermodel oplevert. Bovendien moet het DNA, dat als een blauwdruk codeert voor dit eiwit, gekloneerd zijn waardoor het gen gemakkelijk toegankelijk is voor het doen van molekulaire genetische experimenten (recombinant DNA technieken) waarmee de betreffende aminozuren veranderd kunnen worden. Aan beide voorwaarden voor het uitvoeren van proteïne engineering aan CGTase is voldaan; in 1988 werden de eerste CGTase eiwit kristallen verkregen die geschikt waren voor bepaling van de ruimtelijke structuur en in 1990 werd de aminozuurvolgorde bepaald, afgeleid van de nucleotidevolgorde van het gen. Bovendien werd het betreffende gen gekloneerd in een goed expressiesysteem waarmee grote hoeveelheden extracellulair CGTase eiwit geproduceerd konden worden. Ook werd er een eenvoudige éénstaps zuiveringsmethode voor het eiwit ontwikkeld. Tevens werd er een betrouwbare methode voor het construeren van mutanten ontwikkeld waarmee in de afgelopen jaren tientallen CGTase mutanten gemaakt zijn. Voor het biochemisch karakteriseren van de mutante CGTase enzymen zijn een aantal specifieke methoden voor activiteitsmetingen opgezet en geoptimaliseerd. CGTase katalyseert namelijk vier verschillende reacties: hydrolyse (het knippen van een keten), disproportioneering (een keten wordt geknipt waarna een deel wordt overgezet op een andere keten), cyclisatie (een keten wordt geknipt en daarna weer gekoppeld aan het uiteinde van dezelfde keten, waardoor een cyclodextrine ontstaat) en koppeling (een cyclodextrine wordt geknipt en gekoppeld aan een andere keten).

De gekozen benadering maakte het mogelijk om diverse mutante CGTase eiwitten qua eigenschappen en driedimensionale structuren te karakteriseren. De resultaten hiervan worden in dit proefschrift beschreven. Na de inleiding (hoofdstuk 1) volgen 6 experimentele hoofdstukken waarvan de inhoud hieronder is samengevat.

In **hoofdstuk 2** wordt het kloneren van het gen dat codeert voor CGTase, het bepalen van de DNA volgorde van dit gen, en de opheldering van de driedimensionale structuur van CGTase eiwit uit de bacterie *B. circulans* stam 251 gerapporteerd. De aminozuurvolgorde, die direct af te lezen is van de DNA nucleotide volgorde, liet zien dat er een grote gelijkenis is met het CGTase eiwit uit *B. circulans* stam 8. De driedimensionale structuur liet ook zien dat het eiwit uit 5 delen (domeinen) bestaat, A t/m E. De eerste drie domeinen blijken qua structuur sterk te gelijken op de overeenkomstige drie domeinen van verwante enzymen (•-amylases). Het E-domein lijkt sterk op een algemeen bekend domein dat aan ruw zetmeel kan binden.

Eén van de meest opvallende waarnemingen was dat er voor succesvolle kristallisatie van het CGTase eiwit beslist maltose (glucose-glucose) of cyclodextrine aanwezig diende te zijn. In de structuur werden vervolgens dan ook drie maltoses per eiwitmolecuul gevonden. Deze bevinden zich op zogenaamde maltose-bindingsplaatsen aan het oppervlak van het eiwit, twee in het E-domein en één in het C-domein. Maltose lijkt als een soort lijm tussen de verschillende eiwitmolekulen in het kristal te fungeren.

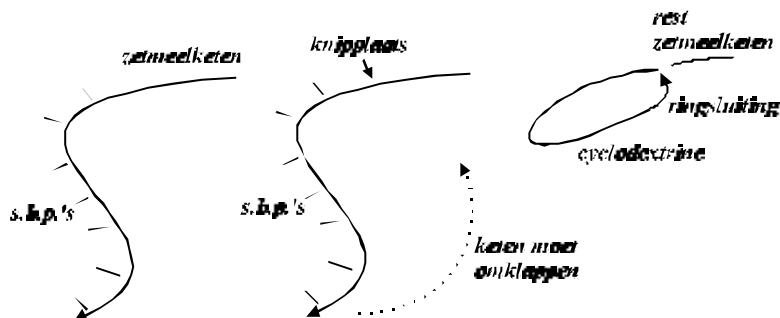


Figuur 3. Schematische weergave van het mechanisme van vouwing van de zetmeelketen rond het centrale aminozuur. In drie stadia is de vorming van een cyclodextrine weergegeven.

In **hoofdstuk 3** worden veranderingen (mutaties) beschreven in het aminozuur tyrosine 195 dat centraal gelegen is in de holte die bekend staat als het actieve centrum van het eiwit; daar vindt de enzym reactie plaats die door het CGTase gekatalyseerd wordt. In de literatuur is eerder gepostuleerd dat de afmetingen van de cyclodextrine produkten bepaald worden door de grootte van dit aminozuur, doordat een zetmeelketen zich rond dit aminozuur zou kunnen slingeren (Figuur 3). Veranderingen in de afmetingen van dit aminozuur zouden dan tot gevolg moeten hebben dat ook de grootte van het produkt navenant verandert. Dit werd nader onderzocht door het centrale aminozuur te vervangen door een viertal andere aminozuren van verschillende grootte. Biochemische karakterisatie van de gezuiverde mutante CGTase eiwitten liet echter zien dat er over het algemeen geen verandering in de grootte van het product plaatsvond. Bij één van de mutanten, met een kleiner aminozuur (leucine) op positie 195, werd een tegenovergestelde verschuiving opgemerkt: er werden juist grotere cyclodextrinen geproduceerd. Het aminozuur tyrosine op deze plaats bleek echter wel zeer belangrijk te zijn voor een hoge cyclodextrine vormende activiteit van het enzym, wellicht door op een efficiënte wijze de zetmeelketen om te buigen. Ook voorkomt tyrosine een hinderlijke nevenreactie, de vorming van korte niet-circulaire (lineaire) suikerketens.

In **hoofdstuk 4** worden mutaties beschreven in drie andere belangrijke aminozuren in het actieve centrum van CGTase, glutamaat 257, aspartaat 229, en aspartaat 328. Bij de door CGTase gekatalyseerde cyclisatiereactie, een zogeheten ‘transglycosylering’, wordt van een zetmeelketen een bepaald deel (bijvoorbeeld een keten van 7 glucosemolekulen) vrijgemaakt, als een reactieve tussenvorm vastgehouden, en vervolgens gekoppeld aan het andere uiteinde van dezelfde keten van 7 glucosemolekulen; hierdoor ontstaat een ring van 7 glucosemolekulen (α -cyclodextrine). Er werden CGTase eiwitten gemaakt met mutaties in elk van de drie hierboven genoemde aminozuren. Bovendien werd er een dubbelmutant gemaakt met veranderingen in twee van de drie aminozuren. De mutanten lieten allen een sterk verlaagde katalytische activiteit in alle vier reacties zien. Het is dus aannemelijk dat elk van deze aminozuren betrokken is bij de betreffende omzettingen.

Kristallen van deze vrijwel inactieve mutante eiwitten werden ook gedrenkt in een oplossing met α -cyclodextrine, of met een lineaire keten van 6 glucosemolekulen. In de driedimensionale structuur van de (mutante) eiwitten werd vervolgens geen cyclodextrine maar een lineaire keten van slechts 4 glucosemolekulen gevonden in de holte van het actieve centrum. Blijkbaar kan het enzym ketens van 4 glucosemolekulen niet omzetten. Dit duidt er op dat de lengte van de keten zeer belangrijk is voor katalyse; contacten van glucosemolekulen met aminozuren in additionele suiker-bindingsplaatsen (s.b.p.'s) zijn blijkbaar essentieel. Ook werden in deze experimenten gebonden cyclodextrinen gevonden op de eerder genoemde maltose-bindingsplaatsen in het E-domein van het CGTase eiwit. Eén van de twee bevindt zich aan de basis van een groeve die naar het actieve centrum leidt; binding van een cyclodextrine daar kan een blokkade vormen voor naar binnen bewegende zetmeelketens, wat een verklaring voor de waargenomen productremming kan zijn.

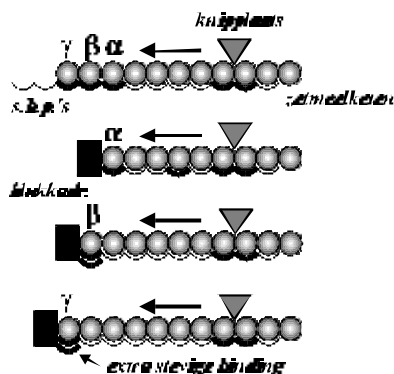


Figuur 4. Schematische weergave van het mechanisme van vouwing van de zetmeelketen langs de zogenaamde suikerbindingsplaatsen (s.b.p.'s) van CGTase. In drie stadia is de vorming van een cyclodextrine weergegeven.

In **hoofdstuk 5** worden de resultaten van drenkingsproeven beschreven met kristallen van een CGTase eiwit en twee verschillende stoffen: Eerst met een bekende remmer van activiteit, acarbose (een verbinding die lijkt op een glucosepolymeer bestaande uit 4 glucosemolekulen), en daarna met een lineair glucosepolymeer bestaande uit 6 glucosemolekulen. In de driedimensionale structuur werd vervolgens tot onze verrassing een 9-delig glucosepolymeer gevonden, half remmer, half glucosepolymeer. De eerste 4 molekulen vormen een halve cirkel, wat lijkt op de helft van een cyclodextrine, maar daarna komen 5 molekulen die een scherpe bocht maken, als in de letter S, en wijzen van het actieve centrum (Figuur 4). Voor de vorming van een cyclodextrine moet het voorste uiteinde, het niet-reducerende uiteinde, een behoorlijke afstand afleggen om te kunnen reageren met het losgekoppelde deel dat zich in het actieve centrum bevindt. Een totaal van 9 s.b.p.'s konden aldus geïdentificeerd worden. Het aantal bezette s.b.p.'s lijkt bepalend voor de grootte van het cyclodextrineproduct. De verwachting was nu dat door de eigenschappen van de individuele s.b.p.'s te veranderen qua bindingsaffiniteit er een verschuiving in cyclodextrine productgrootte verkregen kan worden.

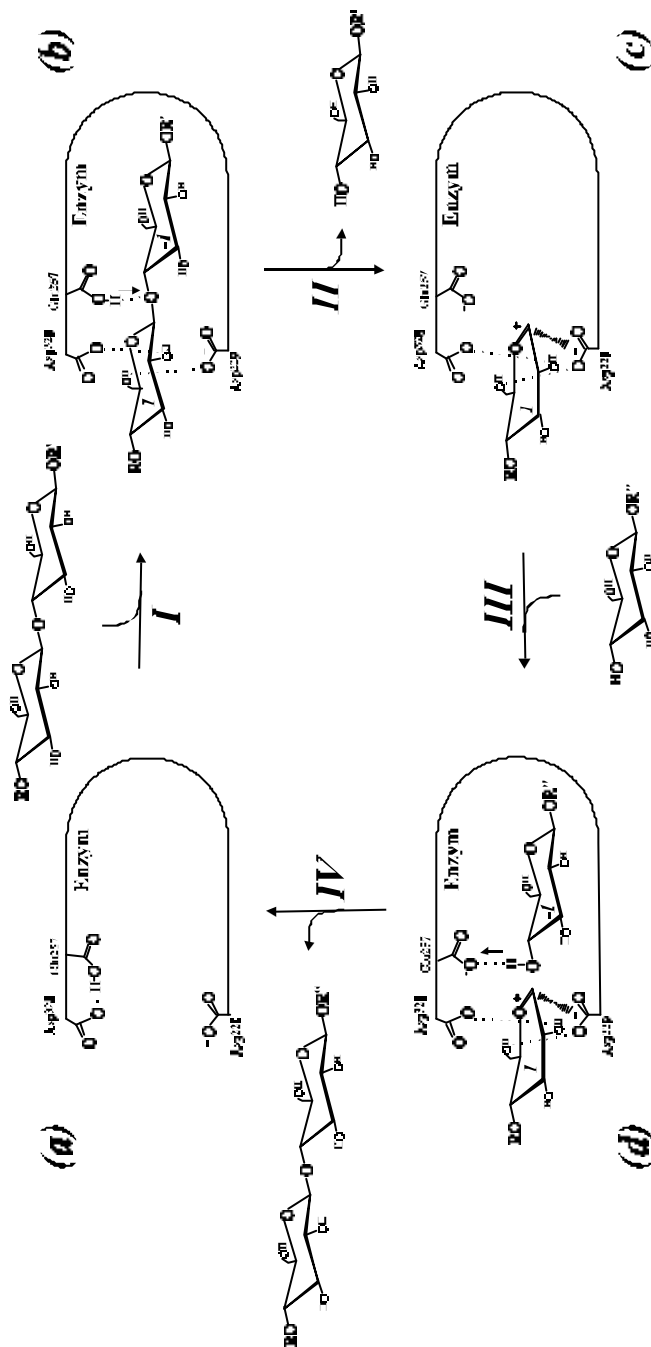
De factoren die bepalend zijn voor de cyclodextrine productgrootte van CGTase werden vervolgens experimenteel nader bestudeerd (**hoofdstuk 6**). Hiertoe werden drie verschillende CGTase mutanten (met tyrosine 89 glycine, tyrosine 89 aspartaat en serine 146 proline) en een dubbelmutant (tyrosine 89 aspartaat / serine 146 proline) geconstrueerd met als doel het verhogen van de productie van de kleinste cyclodextrine (\bullet -cyclodextrine). Deze mutaties bevinden zich in de s.b.p.'s van het eiwit die contact maken met dat deel van de zetmeelketen dat het verst in het eiwit is binnengedrongen (het onderste deel van de S) (Figuur 4 en 5). Deze mutaties bleken inderdaad de verwachte veranderingen te veroorzaken in de snelheden waarmee de verschillende cyclodextrinen gemaakt werden. Ook onder industriële productieproces omstandigheden werd een duidelijke verschuiving in de richting van de productie van \bullet -cyclodextrine waargenomen. De toename was het grootst met de dubbelmutant: In dit geval veranderde de \bullet : \bullet : \bullet -cyclodextrine produktratio van 14:66:20 in 30:51:19, een relatieve toename in \bullet -cyclodextrine van 214 %. Deze resultaten laten duidelijk zien dat mutaties verder weg van het actieve centrum een belangrijke invloed hebben op de cyclodextrine productspecificiteit van het CGTase enzym (Figuur 5).

Tevens werd van de dubbelmutant, gecomplexeerd met een 6-delig glucosepolymeer, de driedimensionale structuur bepaald. Doormiddel van deze structuur en kinetische metingen werden aanwijzingen verkregen voor het bestaan van specifieke reactie inter-mediairen (tussenvormen) voor circularisatie in de vorming van \bullet -, \bullet -, en \bullet -cyclodextrine.



Figuur 5. Schematische weergave van het mechanisme van het schuiven van de zetmeelketen langs de zogenaamde suikerbindingsplaatsen (s.b.p.'s) van het CGTase eiwit. In het bovenste deel is de normale situatie in het wild-type eiwit weergegeven. Hierbij wordt altijd een mengsel van α -, β - en γ -cyclodextrine geproduceerd. Daaronder zijn schematisch de mutaties aangegeven die nodig zijn voor de productie van een specifieke cyclodextrine, respectievelijk α -, β - of γ -cyclodextrine. Om dit te bereiken kunnen zodanige aminozuur mutaties aangebracht worden dat bindingen tussen s.b.p.'s en glucosemolekulen weggehaald of juist toegevoegd worden; ook kunnen er blokkades in s.b.p.'s aangebracht worden.

Het E-domein van CGTase heeft grote overeenkomst met een zogenaamd ruw-zetmeel-bindings-domein. In hoofdstuk 2 zijn in dit domein twee maltose-bindingsplaatsen (MBP) geïdentificeerd. Eén van de twee MBP's (MBP2) is gelegen aan de basis van een groeve die naar het actieve centrum leidt. Vermoedelijk worden zetmeelketens via deze groeve naar het actieve centrum geleid. Binding van een cyclodextrine op MBP2, zoals waargenomen in hoofdstuk 4, kan een blokkade vormen voor de zetmeelketens, wat productremming kan verklaren. In **hoofdstuk 7** worden de resultaten van mutaties gemaakt in MBP1 (tyrosine 633 alanine) en MBP2 (tryptofaan 662 alanine en tryptofaan 616 alanine) beschreven. De gezuiverde mutante CGTase eiwitten werden onderworpen aan bindingsproeven met zetmeelkorrels en aan activiteitsmetingen met opgelost zetmeel waarbij ook gekeken werd naar productremming. Gevonden werd dat MBP1 de belangrijkste plek is voor binding aan zetmeelkorrels (door de beschreven mutatie blijkt het mutante eiwit zijn bindingscapaciteiten te verliezen). Voor MBP2 kon aannemelijk worden gemaakt dat zetmeelketens inderdaad via deze plek het actieve centrum binnengaan, en dat er een vorm van productremming verdwijnt in de MBP2 mutant. Aangezien de MBP's betrokken zijn bij de kristalkontakten tussen de verschillende eiwitmolekulen was het noodzakelijk een alternatieve kristallisatiemethode te ontwikkelen voor de MBP mutant tryptofaan 616 alanine. Er werd een nieuwe methode ontwikkeld waarbij het CGTase eiwit als een dimeer bleek te kristalliseren.



Figuur 6. Schematische weergave van de transglycosyleringsreactie van het CGTase eiwit. I: Een suikermolecuul (R--R') bezet het actieve centrum van CGTase. In het lege actieve centrum (a) vormt aspartaat 328 een waterstofbrug met glutamaat 257, waardoor de pKa waarde voor glutamaat 257 wordt verhoogd. In het bezette actieve centrum (b) worden twee waterstofbruggen tussen het suikermolecuul op s.b.p.1 en aspartaat 328 en aspartaat 229 gevormd. Verder verschuift glutamaat 257 in de richting van het gebonden suikermolecuul en doneert een proton. II: Het suikermolecuul (-R') van s.b.p.-1 heeft een proton opgenomen en verlaat het actieve centrum. In (c) is een positief geladen 'oxo-carbonium-intermediate' gevormd dat door de negatieve lading van aspartaat 229 elektrostatisch gestabiliseerd wordt. III: Een andere suikerketen (-R'') (bij een cyclisatiereactie het niet-reducerende uiteinde van dezelfde keten) bezet s.b.p.-1. In (d) is aangegeven dat het suikermolecuul op s.b.p.-1 een proton kan doneren aan glutamaat 257. IV: Na het doneren van de proton aan glutamaat 257 kan er een nieuwe suikerbinding tussen de suikers op s.b.p.1 en -1 gevormd worden, waarna het product (R--R'') het actieve centrum verlaat en het enzym weer terugkomt in de uitgangssituatie (a).

Concluderend kan er gezegd worden dat er goede en snelle technieken ontwikkeld zijn voor het creëren van CGTase mutanten, het tot overexpressie brengen, het zuiveren en het biochemisch karakteriseren van grote hoeveelheden van deze mutante CGTase eiwitten. Verder is het opmerkelijk dat er twee verschillende kristalvormen werden gevonden: Bij de eerste was beslist maltose benodigd voor kristallisatie; de tweede werd waargenomen bij het onderzoek aan de MBP mutanten (hoofdstuk 7). Door bestudering van de eerstgenoemde kristalvorm werden aan het oppervlak van het CGTase eiwit drie maltose-bindingsplaatsen (MBP) geïdentificeerd; MBP1 is voornamelijk betrokken bij binding van het CGTase eiwit aan ruw zetmeel en MBP2 lijkt betrokken te zijn bij het naar het actieve centrum geleiden van een zetmeelketen. Er werd bovendien aangetoond dat MBP2 cyclodextrine kan binden met als consequentie dat er een vorm van produktremming optreedt. Bij het verlies van de cyclodextrine bindingscapaciteit door een mutatie in MBP2 verdwijnt deze produktremming gedeeltelijk.

Doordat mutaties gemaakt in het actieve centrum, in aminozuren vermoedelijk betrokken bij katalyse, vrijwel inactieve CGTase eiwitten opleverden kon worden aangetoond dat glutamaat 257 hoogstwaarschijnlijk de proton-donor is, dat aspartaat 328 als functie heeft het verhogen van de zogenaamde pKa waarde van glutamaat 257, en dat aspartaat 229 een functie heeft als zogenaamde 'general base' of 'nucleophile'. Aspartaat 328 en aspartaat 229 vormen bovendien waterstofbruggen met het suikermolekuul op s.b.p.1, respectievelijk met de hydroxylgroep op C2 en C6 (zie Figuur 6). Bovendien is het voor activiteit van het CGTase eiwit noodzakelijk dat het substraat langer is dan vier glucosemolekulen.

Voor het centraal in de holte voor katalyse gelegen aminozuur tyrosine 195 kon worden aangetoond dat de grootte van dit aminozuur niet direkt bepalend is voor de produktgrootte in cyclisatie. Een aromatisch aminozuur in deze positie lijkt het buigen van het ketenuiteinde te stimuleren zodat een cyclodextrine kan worden gevormd (cyclisatie) of afgebroken (koppeling) en voorkomt hydrolyse. Via drenkingsproeven van CGTase kristallen met de remmer acarbose en een glucoseketen van 6 molekulen konden 9 s.b.p.'s geïdentificeerd worden. Cyclodextrine productspecificiteit wordt bepaald door de het aantal bezette s.b.p.'s. Proeven met mutanten met veranderingen in deze s.b.p.'s lieten zien dat de cyclodextrine produktratio inderdaad op rationele wijze veranderd kan worden. Door een combinatie van twee mutaties in deze s.b.p.'s werd de productie van α -cyclodextrine sterk verhoogd.